

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2002年 7月 5日

Hirohiko TSUZUKI, et al. Q76105
CARRIER FOR CELL CULTURE
Mark Boland 202-293-7060
July 7, 2003

出 願 番 号
Application Number:

特願2002-196726

[ST.10/C]:

[JP 2002-196726]

出 願 人
Applicant(s):

富士写真フイルム株式会社

2003年 6月 4日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎

出証番号 出証特2003-3043539

【書類名】 特許願

【整理番号】 A21226M

【提出日】 平成14年 7月 5日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 11/10
C12N 5/06

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 都築 博彦

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 相川 和広

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 加藤 淳

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 松浦 晃子

【特許出願人】

【識別番号】 000005201

【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】

【識別番号】 110000109

【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 170347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0205141

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞培養担体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 カチオン性基を有する担体を含み、該担体の表面に形成された海島状のポリペプチド修飾部位を含む細胞培養担体。

【請求項 2】 担体が高分子化合物、無機化合物、又は有機化合物である請求項 1 に記載の細胞培養担体。

【請求項 3】 担体がガラスである請求項 1 に記載の細胞培養担体。

【請求項 4】 担体が高分子含水ゲルである請求項 1 に記載の細胞培養担体。

【請求項 5】 担体がアニオン性高分子含水ゲルである請求項 4 に記載の細胞培養担体。

【請求項 6】 カチオン性基を有する担体が、アニオン性高分子含水ゲルにキトサンを配合した含水ゲル又はアニオン性高分子含水ゲルにキトサンを吸着させた含水ゲルである請求項 5 に記載の細胞培養担体。

【請求項 7】 ポリペプチドが細胞接着性ポリペプチドである請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の細胞培養担体。

【請求項 8】 細胞接着性ポリペプチドが細胞外マトリックス成分である請求項 7 に記載の細胞培養担体。

【請求項 9】 ポリペプチド修飾部位が細胞外マトリックス成分を含む水性ゲルにより形成された請求項 8 に記載の細胞培養担体。

【請求項 10】 1 つの独立したポリペプチド修飾部位の面積が $50 \mu\text{m}^2 \sim 2\text{mm}^2$ である請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の細胞培養担体。

【請求項 11】 請求項 1 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の細胞培養担体の表面に細胞層を形成させる工程を含む細胞培養方法。

【請求項 12】 請求項 11 に記載の方法により得られた細胞培養物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞培養技術や細胞シート工学に利用可能な細胞培養担体に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

近年、各種幹細胞ならびに体細胞への分化誘導法の発見も多数有り臓器移植に変わる新たな医療としてTissue Engineeringが大きく注目されている。この技術はヒトの治療に直接使用する臓器を体内外で構築することを目的としているが、in vitroで臓器様の機能を発現させる手法を数多く実現している。このことから直接臓器を作らず薬理試験用ができ、かつ創薬研究・診断といった膨大な試験数にも対応できるハイスループット (HTS) な細胞評価系として期待されている。また、哺乳類の細胞特有の物質生産が可能な新たな技術としても期待されている。

【 0 0 0 3 】

一方、ヒトゲノム計画によるヒトDNA塩基配列の解析がほぼ終了し、世の中の研究はこの情報を利用したポストゲノムへと移りつつある。近年新聞を賑わしているテーラーメイド医薬もその一つであり、医薬品のみならず創薬、投薬の支援ツールも莫大な市場を生むことが期待されている。現在、このようなツールとしてDNAチップやプロテインチップが注目されており米国ベンチャーをはじめ各社が鎬を削っている。

【 0 0 0 4 】

しかしながら、ヒトゲノムプロジェクトの報告したヒト遺伝子の数は3~4万程度であり、ハエの1.3万と大差が無いのに種を超えて同一である相同遺伝子が多数ある。このことから、種内の個性をDNAのみで判断することはできないこともわかってきた。ヒト遺伝情報はセントラルドグマに従いDNA、RNA、蛋白と経て細胞が構築されるが、情報伝達是一方通行でなく多くの相互作用やフィードバック系を引き連れた非線形な系いわゆる複雑系となっている。生命体にはスタビリティーとロバストネスを持たせる機構が存在する。例えば、肝臓は空腹時、満腹時、飲酒時で同じ遺伝子、細胞、組織でも違う発現系が働く。このため、生命現象を解明するには分子反応のみに注目するのではなく、生命体をシステムとして捕らえたうえでin vivoで細胞や臓器を解析することで得られる境界条件元にシミュレーションで考える試みがされている。この新しい分野はバイオシステム工学と呼ばれにわかに注目されている。

【 0 0 0 5 】

生命現象を的確に捉えるには最低限細胞以上のシステムを取り扱う必要があるが、細胞や組織の本来の機能を維持しつつこれらをアレイとして並べたものが要望されており、細胞アレイ構築法の研究が盛となっている。具体的には、リソグラフィーを用いてガラスなどの固体基板表面の親疎水性を制御する方法(S. N. Bhatia et al, Biotechnol. Prog., 14, 378 (1998)、赤池敏宏ら、特開平5-176753号公報、大塚ら、第30回医用高分子シンポジウム講演要旨集9頁(2001)、菊地ら、第30回医用高分子シンポジウム講演要旨集35頁(2001)など)が知られている。もっとも、こうした方法はリソグラフィー用の高価な装置が必要であり、簡便に細胞培養担体を調製することができない問題がある。

【 0 0 0 6 】

一方、細胞は生体内で組織を形成する際に極性を持って配列することが知られている。例えば、肝細胞は血管内皮細胞側から血液成分を吸収し、逆側から胆汁酸などの代謝物を排泄する。この胆汁酸は細胞毒性が強いため、ガラスなどの不透過性支持体上に細胞を付着させて培養したのでは、長期間の安定な培養が難しいという問題がある。細胞に対して一方向から刺激を与えることで細胞の極性が発現することも知られているが、不透過性支持体上に細胞を付着させて培養したのでは刺激を接着側から与えられない問題がある。また、リソグラフィーを行なうためには光感受性液を予め塗布する必要があるが、物質透過性支持体ではこの光感受性液のほか、反応生成物および現像/定着液が支持体内に浸透してしまい、支持体の変性や支持体中への化合物の残留などにより培養細胞への毒性や刺激が発生するという問題がある。

【 0 0 0 7 】

【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】

本発明の課題は、細胞アレイを簡便に調製するための手段としての細胞培養担体を提供することにある。また、本発明の別の課題は、細胞の両面を異なる培地として培養でき、かつ細胞の生育状況を光学顕微鏡で簡便に行なえる細胞培養担体を提供することを目的とする。本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、下記の構成を採用した細胞培養担体を提供することにより上記の課

題を解決できることを見出した。

【0008】

すなわち、本発明は、カチオン性基を有する担体を含み、該担体の表面に形成された海島状のポリペプチド修飾部位を含む細胞培養担体を提供するものである。この発明の好ましい態様によれば、カチオン性基を有する担体が高分子化合物、無機化合物、又は有機化合物である上記の細胞培養担体；カチオン性基を有する担体がカチオン性基を有する高分子化合物、又は表面修飾によりカチオン性基が導入された無機化合物若しくは有機化合物である上記の細胞培養担体が提供される。また、この発明の好ましい態様によれば、該ポリペプチド修飾部位以外の該担体表面がアニオン性多糖類で被覆された上記の細胞培養担体が提供される。

【0009】

また、上記の発明の別の好ましい態様として、担体が含水ゲルである上記の細胞培養担体が提供され、さらに好ましい態様として含水ゲルが高分子含水ゲルである上記の細胞培養担体、及び含水ゲルがアニオン性高分子含水ゲルである上記の細胞培養担体が提供される。この態様では、カチオン性基を有する担体として、高分子含水ゲルにキトサンを配合した含水ゲル又はアニオン性高分子含水ゲルにキトサンを吸着させた含水ゲルを用いることが好ましい。特に好ましい態様として、担体がアルギン酸を含む含水ゲルであり、カチオン性基を有する担体が該含水ゲルの表面に水溶性カチオン性高分子の水溶液を塗布することにより形成された細胞培養担体、及び担体がアルギン酸を含む含水ゲルであり、カチオン性基を有する担体が該含水ゲルを水溶性カチオン性高分子の水溶液へ浸漬することにより形成された細胞培養担体が提供される。この好ましい態様において、水溶性カチオン性高分子としてキトサンを特に好ましく用いることができる。

【0010】

さらに好ましい態様では、カチオン性基を有する担体の表面を修飾するポリペプチドが細胞接着性ポリペプチドである上記の細胞培養担体；カチオン性基を有する担体の表面を修飾するポリペプチドが細胞外マトリックス成分である上記の細胞培養担体；カチオン性基を有する担体の表面を修飾するポリペプチドがゲル状の細胞外マトリックス成分である上記の細胞培養担体が提供される。また、1つ

の独立したポリペプチド修飾部位の面積が $50\mu\text{m}^2\sim 2\text{mm}^2$ である上記の細胞培養担体；1つの独立したポリペプチド修飾部位の面積が $100\mu\text{m}^2\sim 1\text{mm}^2$ である上記の細胞培養担体が提供される。好ましくは、ポリペプチドの修飾部位は印刷法、スポットティング法、及び／又はインクジェット法により担体表面に形成される。

【0011】

さらに別の観点からは、上記の細胞培養担体の表面に細胞を播種する工程を含む細胞培養方法；上記の細胞培養担体の表面に細胞層を形成させる工程を含む細胞培養方法；及び、上記の細胞培養方法により得られた細胞培養物が提供される。

上記の細胞培養物は、担体表面に海島状に配置されたポリペプチドの表面に形成された細胞層を含んでいる。上記の細胞培養担体の担体がアルギン酸を含む含水ゲルである場合、この細胞培養物からアルギン酸を含む含水ゲルを可溶化することにより実質的に含水ゲルを含まない細胞培養物を得ることができる。すなわち、本発明により、上記の細胞培養担体の表面に細胞層を形成させる工程；及びアルギン酸を含む含水ゲルを可溶化する工程を含む細胞培養物の製造方法が提供される。

【0012】

【発明の実施の形態】

本明細書において「細胞培養担体」とは、細胞を培養する際に培養液中で細胞を保持することができる構造体を意味しているが、この用語はいかなる意味においても限定的に解釈してはならず、最も広義に解釈する必要がある。

【0013】

本発明の細胞培養担体は、カチオン性基を有する担体を含み、該担体の表面がポリペプチドで海島状に修飾されていることを特徴としている。本発明の細胞培養担体に含まれる担体としては、高分子化合物、無機化合物、又は有機化合物などを含む単体を挙げることができるが、これらに限定されることはない。例えば金属板やガラスなどを担体として用いることもできる。より具体的には、カチオン性基を有する担体の例としては、例えば、カチオン性基を有する高分子化合物のほか、表面修飾によりカチオン性基が導入された無機化合物若しくは有機化合物などを挙げることができる。カチオン性基としてはpH8以下で正荷電を有する基

であればその種類は特に限定されないが、例えば、アミノ基；メチルアミノ基、エチルアミノ基等のモノアルキルアミノ基；ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基等のジアルキルアミノ基；イミノ基；グアニニノ基などが挙げられる。

【0014】

担体として利用可能なカチオン性基を有する高分子化合物としては、例えば、キトサン、部分脱アセチルキチン、アミノ化セルロース、ポリリジン、ポリアルギニン、リジンとアルギニンの共重合体、ポリビニルアミン、ポリアニリンやこれらの化合物のアニオンポリマーとのポリイオン錯合体などが挙げられる。無機化合物からなる担体の例としては、ガラスを挙げることができる。

【0015】

表面修飾によりカチオン性基が導入された無機化合物や有機化合物を担体として用いる場合、表面修飾の方法は特に限定されないが、例えば、共有結合を形成する化学反応を用いる方法、イオンの静電相互作用により吸着させる方法、疎水相互作用によりアミノ基を有する化合物を付着させる方法、水不溶性アミノ基含有化合物を塗布する方法などが挙げられる。

【0016】

より具体的には、共有結合を形成する化学反応を用いる方法としてはカップリング剤（シラン、チタンなど）を用いる方法、メルカプト化合物を用いた自己組織化膜、反応活性基（グアニジル、アルデヒドなど）を有するカチオン性化合物を用いた反応などが挙げられる。イオンの静電相互作用により吸着させる方法としてはアニオン性表面に多価カチオン性化合物やカチオン性高分子化合物を吸着させる方法が挙げられる。疎水相互作用によりアミノ基を有する化合物を付着させる方法としてはLB膜などが挙げられる。水不溶性アミノ基含有化合物を塗布する方法としては油溶性化合物（アルキルアミン、ポリアニリンなど）を有機溶剤に溶解し塗布する方法や酸可溶性化合物（キトサンなど）を酸性溶液で塗布したのちpHを上昇させ析出させる方法などが挙げられる。もっとも、表面修飾の方法はこれらの具体例に限定されることはなく、当業者が担体の種類や修飾の目的などに応じて適宜選択可能である。

【0017】

本発明の細胞培養担体の好ましい態様として、担体が含水ゲルである場合を挙げることができる。含水ゲルの好ましい例として、高分子含水ゲルを挙げることができる。本明細書において、高分子含水ゲルとは化学結合によって網目状構造をとり、網目に多量の水を保有したゲル状の物質を意味しているが、この用語はいかなる意味においても限定的に解釈してはならず、最も広義に解釈しなければならない。担体を形成する含水ゲルとして無機物質（シリカゲルなど）の含水ゲルを用いてもよい。

【0018】

高分子含水ゲルを形成する高分子化合物としては、例えば、アニオン性多糖類（アルギン酸、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デキストラン硫酸、アガロペクチン、カラギーナン、カルボキシメチルセルロースなど）やその塩、カチオン性多糖類（キトサン、部分脱アセチルキチン、アミノ化セルロースなど）やその塩、ノニオン性多糖類（デキストラン、セルロース、酢酸セルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルセルロース、アガロース、アミロース、グリコマンナンなど）、ポリペプチド（コラーゲン、ゼラチン、絹フィブロインなど）、合成高分子（ポリアクリル酸、ポリアクリルアミド、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド、ポリエチレンイミン、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコールなど）、及びこれらの混合物や複合体などを挙げることができる。

【0019】

カチオン性基を有する含水ゲルとしては、例えば、キトサンの含水ゲルのほか、高分子含水ゲルにキトサンを配合した含水ゲルや、アニオン性高分子含水ゲルにキトサンを吸着させた含水ゲルを好ましく用いることができる。例えば、キトサンを酸で溶解し、pHを上昇させ水不溶化することにより調製された水性ゲル、あるいはキトサンと水溶性アニオン性高分子（アルギン酸、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デキストラン硫酸、アガロペクチン、カラギーナン、カルボキシメチルセルロース、ポリアクリル酸やその共重合体、ポリメタクリル酸やその共重合体、ポリスチレンスルホン酸やその共重合体など）又は両性高分子（ゼラチン、コラーゲンなど）とのポリイオンコンプレックスによる水性ゲルが挙げられる。ポリイオンコンプレックスによる水性ゲルの製造方法としては、例えば、

キトサン水溶液とアニオン性又は両性高分子水溶液とを混合する方法、あるいはキトサン水溶液とアニオン性又は両性高分子水溶液に水性ゲルを交互に浸漬するいわゆる交互積層（layer-by-layer）法などが挙げられる。ここで交互積層法を用いる場合は最上層（最終浸漬液）をキトサンとすることが好ましい。キトサンを含む上記の含水ゲルにはゲル化に直接寄与しない化合物を添加してもよい。

【0020】

担体を構成する含水ゲルとして、アニオン性高分子含水ゲルを用いることができる。アニオン性高分子ゲルとは、アニオン性高分子の分子中の酸基と多価金属イオンとがキレート構造を形成してゲル化したものを意味しているが、この用語はいかなる意味においても限定的に解釈してはならない。アニオン性高分子のゲル化を引き起こし得る多価金属カチオンの具体例としては、例えば、バリウム（Ba）、鉛（Pb）、銅（Cu）、ストロンチウム（Sr）、カドミウム（Cd）、カルシウム（Ca）、亜鉛（Zn）、ニッケル（Ni）、コバルト（Co）、マンガン（Mn）、鉄（Fe）、マグネシウム（Mg）等の金属イオンを例示でき、これらのうち特に好ましいものとして、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、バリウムイオン、ストロンチウムイオンを例示できる。また、アニオン性高分子含水ゲルは酸基とカチオン残基を有する有機高分子化合物のポリイオンコンプレックスによる含水ゲルでもよい。カチオン残基を有する有機高分子化合物の例としては、ポリリジン、キトサン、ゼラチン、コラーゲンなどの複数のアミノ基を有する化合物が挙げられる。

【0021】

本発明の細胞培養担体を構成する担体として、アニオン性高分子含水ゲルを好ましく用いることができ、アルギン酸を含む含水ゲルが特に好ましく用いられる。アルギン酸を含む含水ゲルとは、アルギン酸の分子中のカルボン酸基と多価金属イオンとがキレート構造を形成してゲル化したものを意味する。アルギン酸は、グルクロン酸（G）とマンヌロン酸（M）よりなるブロック共重合体であり、Mブロックが有するポケット構造に多価金属カチオンが侵入してエッグボックスを形成してゲル化すると考えられている。

【0022】

アルギン酸は、褐藻類の細胞壁構成多糖又は細胞間充填物質として天然に存在しており、これらを原料として採取可能である。原料褐藻類の具体例としては、ヒバマタ目ダービリア科ダービリア属（例えば*D.potatorum*）、ヒバマタ目ヒバマタ科アスコフィラム属（例えば*A.nodosum*）、コンブ目コンブ科コンブ属（例えばマコンブ、ナガコンブ）、コンブ目コンブ科アラメ属（例えばアラメ）、コンブ目コンブ科カジメ属（例えばカジメ、ウロメ）、コンブ目レッソニア科レッソニア属（例えば*L.flavikans*）の褐藻類を例示できる。また、市販のアルギン酸を使用することもできる。アルギン酸のG/Mの比は特に限定されないが、G/Mの比が大きいほどゲル形成能が大きいので、G/Mの比は大きい方が好ましく、具体的には0.1～1であるのが好ましく、0.2～0.5であるのがさらに好ましい（本明細書において「～」で示される数値範囲は上限及び下限の数値を含む）。

【0023】

アルギン酸のゲル化は、常法に従って行なうことができる。アルギン酸のゲル化は、例えばイオン交換を利用して行なうことができる。例えば、アルギン酸ナトリウム水溶液にカルシウムイオンを添加すると速やかにイオン交換が生じ、アルギン酸カルシウムゲルが得られる。より具体的には、アルギン酸ナトリウム水溶液を所望の厚さで塗布用基板上に塗布し、次いで多価金属カチオンもしくはカチオン残基を有する有機高分子化合物の溶液に浸漬することでアルギン酸カルシウムゲル層が得られる。

【0024】

上記の方法を行うにあたり、アルギン酸ナトリウムの濃度は特に限定されないが、例えば0.05質量%～20質量%が好ましく、0.5質量%～10質量%以下が特に好ましい（本明細書において「～」で示される数値範囲は上限及び下限の数値を含む）。また、アルギン酸ナトリウムを塗布する厚さとしては、例えば1 μ m～100mmが好ましく、10 μ m～10mmが特に好ましい。多価金属カチオン溶液の濃度としては0.05mol/L～10mol/Lが好ましく、0.1mol/L～5mol/Lが特に好ましい。多価金属カチオン溶液の溶媒としては、例えば、水、水溶性有機溶剤、又は水と水溶性有機溶剤との混合物を例示することができ、より具体的には、水、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、又はこれらの混合物が好ましく用いられ、水

及びメタノールの混合物が特に好ましく用いられる。

【 0 0 2 5 】

上記の方法を行うにあたり、カチオン残基を有する有機高分子化合物としてポリリジンを用いる場合には、アルギン酸溶液内においてN-ヒドロキシコハクイミドと1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩でリジンを重合しポリリジンを形成させる方法が好ましく用いられる。もっとも、アルギン酸ゲルを形成する方法は上記の特定の方法に限定されるわけではない。当業者は上記の方法を適宜改変ないし修飾し、あるいは他の手段を適宜選択することにより、アルギン酸ゲルを容易に製造することが可能である。

【 0 0 2 6 】

細胞培養担体における担体としてアニオン性高分子含水ゲルを用いる場合、該含水ゲル表面にカチオン性基を導入する方法は特に限定されないが、例えば、アニオン性高分子含水ゲルを水溶性カチオン性高分子の水溶液と接触させる方法が好ましく用いられる。該水溶液への接触方法としては、アニオン性高分子含水ゲルの表面に水溶性カチオン性高分子の水溶液を塗布する方法、又はアニオン性高分子含水ゲルを水溶性カチオン性高分子の水溶液へ浸漬する方法が好ましく用いられる。

【 0 0 2 7 】

本発明の細胞培養担体では、カチオン性基を有する担体の表面がポリペプチドで海島状に修飾されていることを特徴としている。ポリペプチドとしては細胞接着性ポリペプチドを用いることができる。細胞接着性ポリペプチドとしては、細胞毒性がなく、かつ通常の培養条件で細胞が付着するポリペプチドであればその種類は特に限定されず、天然又は合成の任意のポリペプチドを用いることができる。細胞接着性ポリペプチドの性状は特に限定されないが、好ましくはゲル状の細胞瀬着性ポリペプチドを用いることができる。特に好ましいのは、層状の細胞外マトリックス成分ゲルである。

【 0 0 2 8 】

細胞外マトリックスは、一般的には「動物組織中の細胞の外側に存在する安定な生体構造物で、細胞が合成し、細胞外に分泌・蓄積した生体高分子の複雑な会合

体」と定義されており（生化学辞典（第3版）p.570,東京化学同人（株））、細胞を物質的に支持する役割や細胞の活性を調節する役割（すなわち細胞外の情報を細胞に伝えその活性に変化を与える役割）等を担っている。細胞外マトリックス成分であるポリペプチドとしては、例えば、コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、ゼラチン等を例示でき、これらのうち特に好ましいものとして、コラーゲン、アテロコラーゲン、マトリゲル（IV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸よりなるゲル）を例示できる。細胞外マトリックス成分は、常法に従って得ることができる。また、市販の細胞外マトリックス成分を使用してもよい。細胞接着性成分のゲル化は、常法に従って行なうことができる。例えば、細胞接着性成分がコラーゲンである場合には、0.3～0.5%コラーゲン水溶液を37℃で10～20分間インキュベーションすることにより、コラーゲンゲルを得ることができる。細胞外マトリックス成分のゲル化の際には、必要に応じてゲル化剤を使用してもよい。

【0029】

本明細書において「海島状に修飾」という用語は、カチオン性基を有する担体の表面にポリペプチド修飾部位が複数点在していることを意味しており、典型的にはポリペプチド修飾部位が相互に不連続な独立した部位を形成しているものを意味しているが、2以上の修飾部位が相互に連結していてもよい。「海島状」の用語をいかなる意味においても限定的に解釈してはならない。例えば、1つの独立したポリペプチド修飾部位の面積が $50\mu\text{m}^2 \sim 2\text{mm}^2$ であることが好ましく、 $100\mu\text{m}^2 \sim 1\text{mm}^2$ であることが特に好ましい。カチオン性基を有する担体の表面に海島状にポリペプチド修飾部位を形成する方法は特に限定されないが、例えば、該ポリペプチドの溶液を印刷法（平版、凸版、凹版、グラビアなど）、ピン（キャピラリー、先端凹型、先端鳥口など）によるスポッティング法、インクジェット法により担体表面に配置する方法など挙げられるがこれらに限定されることはない。

【0030】

本発明の細胞培養担体において、海島状のポリペプチド修飾部位以外はアニオン性多糖類で被覆されていることが好ましい。アニオン性多糖類での被覆法としては海島状のポリペプチド修飾部位を担体表面に形成した後、アニオン性多糖類の

溶液を該担体表面に塗布するか、該担体をアニオン性多糖類の溶液中に浸漬する方法などが好ましく用いられる。

【 0 0 3 1 】

本発明の細胞培養担体は基板上に形成されていてもよい。担体として含水ゲルを用いる場合には含水ゲルを基板上に形成することが好ましい。基板としては多孔質膜が好ましく用いられるが、多孔質膜の種類は特に限定されない。例えば、アルギン酸ゲルを透過させず、金属イオンなどを透過させることができるものが好ましく用いられる。多孔質膜としては、細孔を有する膜以外に、空隙を有する膜や、細孔と空隙の両方を有する膜等を用いてもよい。多孔質膜の具体例としては、濾紙、限外濾過膜、シリコーンゴム膜、四フッ化エチレン樹脂多孔質膜（PTFE多孔質膜）、不織布、ガーゼ様メッシュ、各種メンブレンフィルター（ナイロン、ポリフッ化ビニリデン、アセチルセルロース、ニトロセルロース、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネートなど）等を例示でき、好ましいものとしては、メンブレンフィルターであり、特にナイロンメンブレンフィルター膜が好ましい。多孔質膜が細孔を有するものである場合、細孔の大きさは通常は $0.02 \sim 1,000 \mu\text{m}$ であり、好ましくは $0.02 \sim 100 \mu\text{m}$ であり、さらに好ましくは $0.1 \sim 10 \mu\text{m}$ である。

【 0 0 3 2 】

本発明の細胞培養担体を用いて、その表面上に細胞を培養することができる。培養し得る細胞の種類は特に限定されないが、例えば、繊維芽細胞、血管内皮細胞、軟骨細胞、肝細胞、小腸上皮細胞、表皮角化細胞、骨芽細胞、骨髄間葉細胞、胚性幹細胞、体性幹細胞等を例示できる。細胞の培養の際には、通常、細胞濃度 $1 \sim 1.5$ 万cells/mlの培養液（例えば、D-MEM培地、MEM培地、HamF12培地、HamF10培地）を本発明の細胞培養担体の表面に添加する。細胞の培養条件は、培養する細胞に従って適宜選択し得る。通常、培養は担体表面にコンフルエントな単層の細胞層が形成されるまで行なうことができる。

【 0 0 3 3 】

本発明の細胞培養担体を用いて、担体表面に複数種の細胞を平面共培養することができる。例えば、細胞接着性ポリペプチド上でのみ増殖可能な繊維芽細胞や肝

細胞等の細胞を培養して担体表面のポリペプチド修飾部位に該細胞の単層を形成させた後、ポリペプチド修飾部位以外の表面を被覆しているアニオン性多糖類上に接着する血管内細胞等の細胞を培養することにより、2種類の細胞を含む細胞培養物を製造できる。

【0034】

本発明の細胞培養担体を用いた細胞の培養は具体的には次のようにして行なうことができる。細胞培養担体をシャーレ等の内部に設置し、シャーレ内に適当な培養液（例えば、D-MEM培地、MEM培地、HamF12培地、HamF10培地）を添加して5分浸漬後、培地交換を3回繰り返したのち12～24時間放置し、培養液を細胞培養担体中に浸潤させる。シャーレ内の培養液を捨て、細胞培養担体のゲル層上に細胞を播き、シャーレ内に適当な培養液（例えば、D-MEM培地、MEM培地、HamF12培地、HamF10培地）を添加する。37℃で1～2時間放置し、担体表面に細胞を保持（接着）させた後、37℃で培養を続ける。培養の際には、必要に応じて培養液を交換してもよい。通常は培養0.5～2日ごとに培養液を交換する。もっとも、細胞培養の方法は上記の特定の方法に限定されることはなく、当業者が適宜選択可能であることは言うまでもない。

【0035】

本発明の細胞培養担体を用いて細胞を培養により得られる細胞培養物は、本発明の細胞培養担体と該担体表面に保持された細胞層からなる細胞アレイとを含んでいるが、細胞培養担体の表面に保持された細胞アレイは、例えば細胞接着性ポリペプチドであるコラーゲンの表面に形成された細胞層であり、例えば単層の細胞層を含む細胞アレイである。

【0036】

本発明の細胞培養担体を用いた細胞培養物上に、別に調製した細胞シートを載せることによって、重層化培養を行ってもよい。重層化する細胞層として、例えば、血管内皮細胞層、肝細胞層を使用すれば、肝臓の3次元組織構造物を構築できる。この3次元組織構造物は、*in vitro*における薬物の透過性試験へ適用できるとともに、動物実験代替モデルや移植用臓器へ応用できる。重層化した細胞層は、細胞層を構成する細胞の種類に応じた培養条件で培養することができる。培養

の際には、例えば、D-MEM培地、MEM培地、HamF12培地、HamF10培地等の培地を使用できる。例えば、本発明の細胞培養担体を用いた細胞培養物が平面共培養となっている場合、さらに重層化することで3次元状に細胞組織を構築することが可能となる。

【0037】

担体としてアルギン酸を含む含水ゲルを用いた場合には、上記のようにして得られた細胞培養物のアルギン酸ゲル層を可溶化処理することにより、培養された細胞を細胞シート又は細胞アレイとして脱離させることもできる。アルギン酸ゲル層の可溶化処理は、アルギン酸ゲルを構成するカチオン成分を除去することにより行うことができる。カチオン種が多価金属イオンの場合は、例えば、リン酸などの多価金属カチオンと錯形成又は難溶性塩を形成するイオンの添加、キレート剤水溶液の使用、培地中の多価金属イオンの低減、培地中の多価金属イオンのキレート剤による隠蔽によって実施できる。通常、細胞培養用の培地にはリン酸イオンが多く存在するため、予め多価金属イオンを除去した培地もしくは多価金属カチオンの総和モル数に対して90モル%以上のキレート剤を添加した培地に浸漬する方法が細胞への侵襲を低減する観点から好ましく用いられる。該キレート剤の濃度は90モル%~10000モル%が好ましく、90モル%~1000モル%がさらに好ましい。

【0038】

キレート剤の種類は特に限定されないが、例えば、エチレンジアミンジオルトヒドロキシフェニル酢酸、ジアミノプロパン四酢酸、ニトリロ三酢酸、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸、ジヒドロキシエチルグリシン、エチレンジアミン二酢酸、エチレンジアミンニプロピオン酸、イミノ二酢酸、ジエチレントリアミン五酢酸、ヒドロキシエチルイミノ二酢酸、1,3-ジアミノプロパノール四酢酸、トリエチレンテトラミン六酢酸、トランスシクロヘキサンジアミン四酢酸、エチレンジアミン四酢酸(edta)、グリコールエーテルジアミン四酢酸、0,0'-ビス(2-アミノエチル)エチレングリコール-N,N',N'-四酢酸(egta)、エチレンジアミンテトラキスメチレンホスホン酸、ジエチレントリアミンペンタメチレンホスホン酸、ニトリロトリメチレンホスホン酸、1-ヒドロキシエチリデン-1,1-ジ

ホスホン酸、1,1-ジホスホノエタン-2-カルボン酸、2-ホスホノブタン-1,2,4-トリカルボン酸、1-ヒドロキシ-1-ホスホノプロパン-1,3,3-トリカルボン酸、カテコール-3,5-ジスルホン酸、ピロリン酸ナトリウム、テトラポリリン酸ナトリウム、ヘキサメタリン酸ナトリウムが挙げられ、特に好ましくは例えばジエチレントリアミン五酢酸、トリエチレンテトラミン六酢酸、1,3-ジアミノプロパノール四酢酸、グリコールエーテルジアミン四酢酸、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸、2-ホスホノブタン-1,2,4-トリカルボン酸、1,1-ジホスホノエタン-2-カルボン酸、ニトリロトリメチレンホスホン酸、エチレンジアミンテトラホスホン酸、ジエチレントリアミンペンタホスホン酸、1-ヒドロキシプロピリデン-1,1-ジホスホン酸、1-アミノエチリデン-1,1-ジホスホン酸、1-ヒドロキシエチリデン-1,1-ジホスホン酸やこれらの塩を挙げることができる。これらのうち特に好ましいものとしてはedta、egtaを例示できる。

【0039】

キレート化剤を用いたアルギン酸ゲル層の可溶化処理は、その表面にアルギン酸を含む水性ゲルが形成された多孔質膜からキレート化剤をしみこませて行なうのが好ましい。これによって、多孔質膜とアルギン酸ゲル層とを容易に分離することができ、細胞培養物を多孔質膜から容易に脱離させることができる。アルギン酸ゲル層の可溶化処理によってアルギン酸ゲル層を完全に除去する必要はなく、可溶化されなかったアルギン酸ゲル層が残っていてもよいが、アルギン酸ゲル層はできるだけ可溶化して除去するのが好ましい。

【0040】

アルギン酸ゲル層を可溶化処理して得られる細胞培養物は細胞層又は細胞アレイを含んでいるので、細胞層の重層化又は転写などに使用できる。細胞層の重層化の際には、予め培養した細胞上に荷重をかけた状態で培養したのちアルギン酸ゲルを可溶化してもよく、あるいはアルギン酸ゲル層を可溶化して得られる細胞培養物同士を重層化してもよい。また、アルギン酸ゲル層を可溶化して得られる細胞培養物を別に作製した細胞層に重層化してもよい。重層化する細胞層の細胞の種類は、同一であっても異なってもよい。重層化する細胞層の数は特に限定されないが、通常1～10、好ましくは1～5、さらに好ましくは1～3である。

また、細胞層の転写際には、別の細胞培養用基材上に荷重をかけた状態で培養したのちアルギン酸ゲルを可溶化してもよく、あるいはアルギン酸ゲル層を可溶化して得られる細胞培養物を他の媒体に転写してもよい。好ましい重層化又は転写方法としては予め培養した細胞上もしくは別の細胞培養基材上に荷重をかけた状態で培養したのちアルギン酸ゲルを溶解する方法を挙げることができる。

【0041】

荷重をかけた細胞の培養法は特に限定されず、細胞が転写される細胞又は基材にムラが生じない程度に充分荷重がかけられていけばいかなる方法でもよい。ここで、荷重をかける際に細胞が密閉されると窒息をすることから、転写する側もしくは受ける側の少なくとも一方が細胞培養基材が水透過性のゲルや多孔質膜もしくはこれらの組み合わせでできていることが好ましい。また、ムラ無く転写するには細胞面を十分に覆う状態で荷重をかける必要があるが、均一に接触することで酸素の拡散を妨害することとなるため、不織布（ナイロン、ポリエステル、ステンレスなど）等を介して酸素の拡散を妨げないで荷重することが好ましい。

【0042】

荷重をかけた細胞の培養法における荷重は $0.1\text{ g/cm}^2 \sim 50\text{ g/cm}^2$ であることが好ましく、 $0.5\text{ g/cm}^2 \sim 10\text{ g/cm}^2$ であることがさらに好ましい。荷重をかけた細胞の培養の時間は充分な細胞の転写が実現できれば特に限定されないが、4時間～72時間が好ましく、6時間～48時間がさらに好ましい。

【0043】

本発明の細胞培養担体は、いかなる方法で滅菌されてもよいが、電子線、 γ 線、X線、紫外線などの放射線による滅菌が好ましく用いられ、電子線、 γ 線、紫外線がさらに好ましく用いられ、電子線滅菌が特に好ましい。本発明の電子線滅菌の照射線量としては 0.1 kGy 以上 65 kGy 以下が好ましく、 1 kGy 以上 40 kGy 以下が特に好ましい。EOG滅菌などの化学滅菌、高圧蒸気ガス滅菌などの高熱をかける滅菌は細胞接着性層やアルギン酸ゲル層を分解するため好ましくない。このように滅菌した細胞培養担体は無菌条件下であれば長期間に渡って室温保管が可能である。上記滅菌法は単独もしくは複数種の組み合わせで実施されてもよく、同一種の滅菌法を繰り返し使用してもよい。

【 0 0 4 4 】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

実施例 1 : 細胞培養担体の作製

(1) アルギン酸含水ゲル膜の調製

5重量%のアルギン酸ナトリウム（和光純薬製）水溶液を500 μ mの厚さでステンレス基板上に塗布し、塗布物を0.5mol/lの塩化カルシウム水/メタノール（容量比80/20）溶液に浸漬した。塗布物が充分ゲル化したのち、塗布物を流水で洗浄した。さらに、膜が変形しないように4辺を挟んだ状態で乾燥し、アルギン酸カルシウム含水ゲル膜を得た。

【 0 0 4 5 】

(2) キトサン修飾

上記(1)で得たアルギン酸含水ゲル膜を1重量%の水溶性キトサン（和光純薬製）水溶液に1時間浸漬したのち、流水で1時間以上洗浄した。キトサン修飾膜は乾燥せず水中に保管した。

(3) コラーゲン修飾

上記(2)で得たキトサン修飾膜を0.03mg/mlとなるように水で希釈したCellmatrix IC（新田ゼラチン製type I コラーゲン水溶液）を先端鳥口状のステンレスピンでスポットしたのち、流水で1時間以上洗浄した。さらに、膜が変形しないように4辺を挟んだ状態で乾燥し、海島状にコラーゲンで表面修飾したアルギン酸カルシウム含水ゲル膜（サンプル1）を得た。このときのスポットの様子を図1に示す。また、スポットをキャピラリー（Drummond Scientific製MICROCAPS、容量5 μ l）でスポットしたものをサンプル2とした。

【 0 0 4 6 】

(4) ヒアルロン酸修飾

サンプル1および2を0.1重量%ヒアルロン酸ナトリウム（和光純薬製、鶏冠製）水溶液に1時間浸漬したのち、流水で1時間以上洗浄した。さらに、膜が変形しないように4辺を挟んだ状態で乾燥し、サンプル3および4（海島状にコラーゲン

で表面修飾し、コラーゲン修飾部位以外をヒアルロン酸で被覆したアルギン酸カルシウム含水ゲル膜)を得た。

【0047】

(5) コラーゲン付着部の評価

①免疫染色

上記で得たサンプルをPBS+ (GIBCO製10×Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, without Calcium Chloride, without Magnesium Chloride 100mlに水899mlと100g/l塩化マグネシウム六水和物と100g/l塩化カルシウムを含んだ水溶液1mlを混合)で膜を洗浄したのち、マニュアルに従って調製したTBS Blotto B溶液に室温で2時間浸漬した。TBS Blotto B溶を充分に除去したのち、一次抗体として抗Type-Iコラーゲンウサギ抗体 (Santa Cruz Biotechnology製) をかけ1時間放置し、その後PBS+で洗浄した。次いで、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識した抗ウサギ抗体 (DAKO製Envision⁺™ Peroxidase) をかけ1時間放置したのち、PBS+で洗浄した。洗浄液を充分除去したのち、氷冷下DAB基質液 (DAKO製Liquid DAB+ Substrate-Chromogen Systemをマニュアルに従って調液したもの) で2分間反応させた。サンプル1～4にはいずれも海島状のコラーゲン付着部が形成されていることがわかった。1つの独立したコラーゲン付着部の面積はサンプル1及び3で0.05mm²、サンプル2及び4では0.8mm²であった。サンプル3の染色の様子を図2に示す。

【0048】

②XPS

上記で得たサンプルの表面をXPSのN原子、C原子、O原子それぞれの1s軌道の化学シフトを解析することで最表層の化合物を評価したところ、サンプル1～4のコラーゲンスポット部がコラーゲンからなること、及びコラーゲンスポット部以外の部分はサンプル1及び2ではキトサン、サンプル3及び4ではヒアルロン酸からなることがわかった。

【0049】

(6) 滅菌

上記で得られた担体に対してUV滅菌3時間、電子線滅菌20kGyの6種類の滅菌を施

したところ、いずれも菌が確認されなかった。滅菌処理を施していないサンプルからは5900個/ m^2 の菌が確認された。

【0050】

比較例 1

実施例 1 においてアルギン酸含水ゲルの代わりにポリエチレンテレフタレート (PET) およびガラスを用いてコラーゲン修飾までの操作を行ったところ、コラーゲンの付着は確認されなかった。

【0051】

実施例 2 : ガラスの修飾

担体としてガラスを用い、10重量%の3-アミノプロピルトリエトキシシラン (和光純薬製) 水溶液に浸漬し、50℃で2時間放置したのち、流水で1時間洗浄してアミノ基導入ガラスを調製した。実施例1においてアルギン酸含水ゲルの代わりにこのアミノ基導入ガラスを用いてコラーゲン修飾までの操作を行ったところ、コラーゲンの付着が確認された。

【0052】

実施例 3 : 細胞の培養

次のようにして細胞培養担体を用いた細胞の培養を行なった。

(1) 使用細胞

CHL (Chinese Hamster Lung Cell)

(2) 使用培地

Eagle最小培地、10%牛胎児血清

(3) 細胞培養担体

実施例 1 のサンプル 3 及び4、並びに細胞培養担体をポリスチレン製細胞培養用シャーレの底面に両面テープで貼り付けたものをUV滅菌した後、培地を添加して5分浸漬し、培地交換を3回繰り返したのち一晚放置して培地を細胞培養担体中に浸潤させた。ポリスチレン製細胞培養用シャーレのみを比較例として同様の操作を行った。

【0053】

(4) 細胞の播種

予め培養しておいた細胞をトリプシン処理で回収し、細胞濃度を50000cell/mlに調整した。セル及びシャーレ内の培地を捨てた後、この細胞液を細胞数10000cell/cm²となるようにシャーレ内に播種して培地を添加した。

(5) 培養

CO₂インキュベーターを用いて37℃で2日間培養した。

【0054】

(6) 結果

いずれのサンプルも細胞接着性、細胞培養担体の剥離、及び細胞毒性に問題はなかった。実施例1のサンプル3及び4についてはコラーゲン付着部のみに細胞が海島状に培養され、細胞アレイが形成されていた。

【0055】

試験例：アルギン酸カルシウム、キトサンおよびコラーゲンへの吸着評価

実施例1で調製したアルギン酸カルシウム含水ゲル、キトサン修飾したアルギン酸カルシウム含水ゲル、及びキトサン修飾したアルギン酸カルシウム含水ゲルを0.03mg/mlとなるように水で希釈したCellmatrix IC（新田ゼラチン製type I コラーゲン水溶液）に浸漬した後に水洗して調製したコラーゲン修飾ゲルを、コラーゲン、キトサン、ヒアルロン酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウムのそれぞれ0.1重量%の水溶液に浸漬し、水洗したのちXPSで吸着性を評価した。結果を表1に示す。キトサン上には評価した全ての高分子化合物が付着し、コラーゲン上には評価した全ての高分子化合物が付着しなかった。

【0056】

【表1】

	アルギン酸Na	キトサン	コラーゲン	ヒアルロン酸Na
アルギン酸カルシウム含水ゲル	評価せず	付着する	付着する	付着せず
キトサン修飾したアルギン酸カルシウム含水ゲル	付着する	評価せず	付着する	付着する
コラーゲン修飾したアルギン酸カルシウム含水ゲル	付着せず	付着せず	評価せず	付着せず

【 0 0 5 7 】

【発明の効果】

本発明の細胞培養担体を用いて細胞を培養することにより細胞アレイを容易に形成することができる。

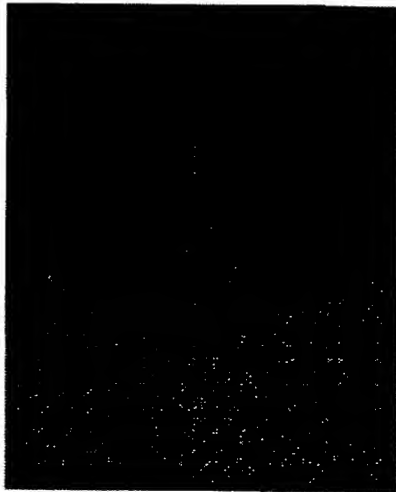
【図面の簡単な説明】

【図 1】 細胞接着性ポリペプチド（コラーゲン）を担体表面にスポットして海島状の修飾部位を形成する様子を示した図である。

【図 2】 担体表面に形成された海島状のコラーゲン修飾部位を免疫染色した結果を示した図である。

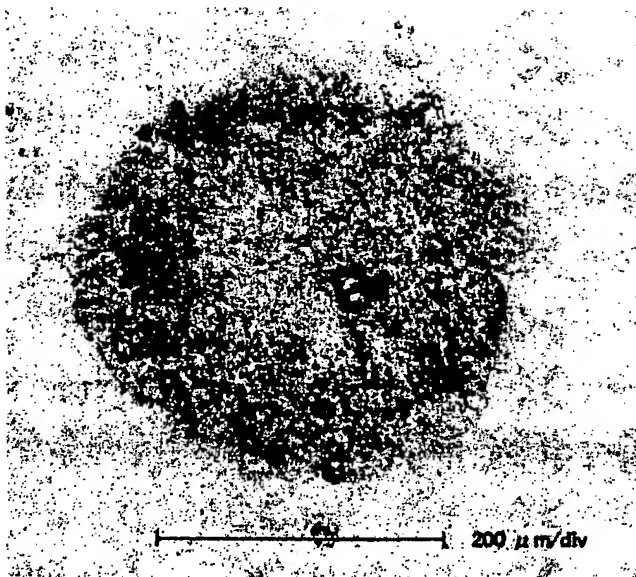
【書類名】 図面

【図1】



←1.5mm→

【図2】



200 μ m/div

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細胞培養技術や細胞シート工学に利用可能な細胞培養担体を提供する

。

【解決手段】 アニオン性高分子含水ゲルにキトサンを配合した含水ゲル又はアニオン性高分子含水ゲルにキトサンを吸着させた含水ゲルなどのカチオン性基を有する担体を含み、該担体の表面に形成された海島状のポリペプチド修飾部位を含む細胞培養担体。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005201]

1. 変更年月日	1990年 8月14日
[変更理由]	新規登録
住 所	神奈川県南足柄市中沼210番地
氏 名	富士写真フイルム株式会社